Journal of Horticultural Science
https://jhs.um.ac.ir

Research Article
Vol. 38, No. 2, Summer 2024, p. 407-418

The Effect of Phosphate Solubilizing Bacteria on the Amount of Morphine, Papaverine, and Noscapine Alkaloids of *Papaver somniferum* L.

S. Samavat[1*], M. Salehi Vozhdehnazari[2], M. Yahyazadeh Balalami[1], M. Rahimifard[1]
1 and 2- Assistant Professor and Ph.D., Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: samaneh.samavat@gmail.com)

Received:	04-12-2023	**How to cite this article:** Samavat, S., Salehi Vozhdehnazari, M., Yahyazadeh Balalami, M., & Rahimifard, M. (2024). The effect of phosphate solubilizing bacteria on the amount of morphine, papaverine, and noscapine alkaloids of *Papaver somniferum* L.. *Journal of Horticultural Science*, *38*(2), 407-418. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jhs.2024.85697.1306
Revised:	29-01-2024	
Accepted:	13-02-2024	
Available Online:	13-02-2024	

Introduction

So far, more than 40 different types of alkaloids have been known in poppy (*Papaver somniferum* L.) as a valuable medicinal plant, the most important of which are morphine, codeine, thebaine, noscapine, and papaverine. The biosynthesis of these alkaloids may be strongly influenced by a variety of biotic and abiotic elicitors. In fact, microbes as biotic elicitors can affect the production of poppy alkaloids. Among them, plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) can be noticed, which stimulate and improve plant growth through various mechanisms such as mineral phosphate solubilization, plant hormone production, siderophores secretion, nitrogen fixation, etc. The use of PGPR agents can not only lead to an increase in plant biomass, but simultaneously, due to their role as biotic elicitors, they cause to an increase in the biosynthesis of secondary metabolites in plants. These biotic elicitors target plants' defense mechanisms and result in triggering a series of metabolic changes throughout the plant. The use of PGPR agents to stimulate the plant to produce secondary metabolites has several advantages: First, in some plants, defensive metabolites are active biological compounds that lead to the induction of food production with high added-value in the plants. Secondly, physiologically, with the increase in the synthesis of secondary metabolites, the resistance of the plant against pathogens also increases. Accordingly, the present study was performed with the aim of investigating the effects of bacterial strains with the ability to solubilize inorganic phosphate as biotic elicitors on the amount of morphine, papaverine, and noscapine alkaloids in *P. somniferum*.

Materials and Methods

In this research, the solubility of inorganic phosphate by four bacterial strains including *Enterobacter xiangfangensis* S2, *Pantoea dispersa* S7, *Pantoea stewartii* S25, and *Pseudomonas canadensis* S36 was evaluated quantitatively using Sperber broth medium. Under greenhouse conditions, the effect of foliar spraying of *P. somniferum* plants with a suspension of the bacterial strains (10^8 CFU.ml^{-1}) on the amount of morphine, papaverine, and noscapine in the plants' capsules, stems, and leaves was investigated. About three weeks after the appearance of capsules in poppy plants, the aerial parts of the plants (stems, leaves, and capsules) were sprayed with the bacterial suspensions. One week after foliar spraying, poppy plants were harvested in order to determine the amount of the desired alkaloids. Three pots were considered for each treatment and there were three poppy plants in each pot. Alkaloids were extracted based on an alcoholic method and detected using HPLC. Morphine and noscapine standards were prepared at a concentration of 1000 µg.ml^{-1} and papaverine standard at a concentration of 250 µg/ml. Then the mixture was prepared in proportions of 1, 1:50, 1:10, 1:50 and 1:100 and injected into the HPLC set to draw the calibration curve. All the experiments were conducted in a form of completely randomized design with three replications for each treatment (P<0.05).

https://doi.org/10.22067/jhs.2024.85697.1306

Results and Discussion

The results showed that the highest (458.67 µg.ml^{-1}) and the lowest (130.47 µg.ml^{-1}) phosphate solubility were related to S2 and S36 strains, respectively. S7 and S25 strains were not statistically significantly different from each other and after S2 strain, they were placed in the second statistical position. In the bacterial strains' treatments, the level of morphine in the stems and leaves as well as the capsules increased significantly in most cases compared to the control. The amount of papaverine in the stems and leaves decreased significantly, but it had no significant changes in the capsule. Also, noscapine showed a significant increase in the stems and leaves and reached from 0.8 mg.g^{-1} DW in the control to 8.12 in the S2 treatment. While, the amount of noscapine increased significantly in the capsules, only in the S2 and S36 treatments. Other strains did not show significant differences with the control for noscapine content in the capsules. The results showed that the interaction effects of the type of the alkaloids and the use of phosphate solubilizing bacterial strains on the concentration of the studied alkaloids in poppy stems, leaves and capsules are significant (P<0.01).

Conclusion

It can be concluded that there is no need to apply genetic engineering to increase the production of valuable secondary metabolites by medicinal plants. Rather, this goal can be achieved much cheaper by using bacterial elicitors. Accordingly, by selecting compatible and efficient bacterial strains with phosphate solubilizing activity, the amounts of morphine, papaverine, and noscapine alkaloids in the aerial parts of *P. somniferum* as a valuable medicinal plant can be noticeably increased.

Keywords: Alkaloid, Bacterium, Elicitor, HPLC, PGPR

نشریه علوم باغبانی
https://jhs.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۸، شماره ۲، تابستان ۱٤۰۳، ص. ٤۱۸-٤۰۷

اثر باکتری‌های حل‌کننده فسفات بر میزان آلکالوئیدهای مورفین، پاپاورین، و نوسکاپین خشخاش (*Papaver somniferum* L.)

سمانه سماوات[1]* - مهدیه صالحی وژده نظری[2] - مهدی یحیی‌زاده بلالمی[1] - مهشید رحیمی فرد[1]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۹/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۲۴

چکیده

تاکنون بیش از ۴۰ نوع آلکالوئید مختلف در گیاه دارویی و ارز شمند خ شخاش (*Papaver somniferum* L.)، شناخته شده که مهم‌ترین آن‌ها مورفین، کدءین، تباءین، نو سکاپین و پاپاورین ا ست. بیو سنتز این آلکالوئیدها ممکن ا ست به شدت تحت تأثیر انواعی از الیسیتورهای زنده و غیرزنده قرار گیرد. پژوهش حاضـــر با هدف بررســـی اثرات ســـویه‌های باکتریایی با قابلیت حل‌کنندگی فســـفات معدنی به‌عنوان الیســـیتورهای زنده، بر میزان تولید آلکالوئیدهای مورفین، پاپاورین، و نو سکاپین در گیاه خ شخاش انجام شده ا ست. در این پژوهش، قابلیت حل‌کنندگی ف سفات معدنی تو سط چهار سویه باکتریایی S2 *Enterobacter xiangfangensis*، S7 *Pantoea dispersa*، S25 *Pantoea stewartii* و *Pseudomonas canadensis* S36 به‌روش کمّی و به کمک محیط کشـت مایع Sperber ارزیابی شـد. در شـرایط گلخانه، اثر محلول‌پاشـی بوته‌های خشـخاش با سـوسـپانسـیون سویه‌های باکتریایی (10^8 CFU.ml^{-1}) بر میزان آلکالوئید های مورفین، پاپاورین، و نو سکاپین موجود در کپ سول، ساقه، و برگ خ شخاش برر سی شد. آلکالوئیدها به‌روش الکلی استخراج و توسط دستگاه HPLC ردیابی شدند. تمامی آزمون‌ها در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی و با سه تکرار به‌ازای هر تیمار انجام شـــدند (P<0.05). نتایج نشــــان داد که بیشــــترین (۴۵۸/۶۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و کمترین (۱۳۰/۴۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر) میزان حل‌کنندگی فسفات به‌ترتیب مربوط به سویه‌های S2 و S36 بود. در تیمار با سویه‌های باکتریایی مشخص شد که سطح مورفین موجود در ساقه و برگ و نیز کپ‌سول در اغلب موارد افزایش معنی‌داری در قیاس با شاهد را نشان داد. میزان پاپاورین موجود در ساقه و برگ کاهش معنی‌داری دا شت، ولی در کپ‌سول تغییرات معنی‌داری ندا شت. نو سکاپین موجود در ساقه و برگ نیز افزایش معنی‌داری دا شت و از ۰/۸ میلی‌گرم بر گرم وزن خ شک در شاهد به ۸/۱۲ در تیمار S2 رسید. درصورتی‌که میزان نوسکاپین کپسول فقط در تیمار با S2 و S36 افزایش معنی‌داری داشت و سایر سویه‌ها اختلاف معنی‌داری با شـاهد نداشـتند. به این ترتیب با انتخاب سـویه‌های باکتریایی سـازگار و کارآمد از گروه باکتری‌های حل‌کننده فسـفات، می‌توان سـطح آلکالوئیدهای مورفین، پاپاورین، و نوسکاپین در اندام‌های هوایی گیاه دارویی و ارزشمند خشخاش را به‌طور چشمگیری افزایش داد.

واژه‌های کلیدی: آلکالوئید، الیسیتور، باکتری، HPLC، PGPR

مقدمه

خشخاش (*Papaver somniferum* L.) گیاهی علفی و یک ساله به ارتفاع ۳۰ تا ۸۰ سانتی‌متر، متعلق به تیره خشخاش (Papaveraceae) است. تاکنون برای این گونه، زیرگونه و واریته‌های مختلفی معرفی شده است. منشأ این گونه به احتمالی مناطق مدیترانه‌ای است و کشت آن به دوره ماقبل تاریخ برمی‌گردد. این گیاه بومی آسیا و اروپای جنوب شرقی است و به‌راحتی از مزرعه به رویشگاه‌های طبیعی نفوذ می‌نماید و تقریباً شکل انتشار طبیعی پیدا می‌کند. به لحاظ خصوصیات گیاه‌شناختی، دارای ساقه‌هایی قائم با و یا بدون انشعاب و به رنگ سبز تا سبز مایل به خاکستری است. ریشه‌های آن سطحی و دارای برگ‌های منفرد و متناوب تخم مرغی، مستطیلی یا قلبی به رنگ سبز کدر و دارای دندانه‌های عمیق است. گل‌های آن درشت است و در

۱ و ۲- به‌ترتیب استادیار و دکتری، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
(*- نویسندهٔ مسئول: Email: samaneh.samavat@gmail.com)

https://doi.org/10.22067/jhs.2024.85697.1306

واریته‌های مختلف به رنگ‌های سفید و یا قرمز مایل به بنفش دیده می‌شود. میوه آن از نوع کپسول کمویش کروی است که در قاعده دارای یک پایک کوتاه است. این گونه دارای سلول‌های خاص یا مجراهایی است که حاوی شیرابه شیری رنگی است. این شیرابه شامل ۱۰ تا ۱۵ درصد آب، ۲۰ درصد مواد قندی، مقادیری اسیدهای آلی همچون اسید لاکتیک، اسید اگزالواستیک و اسید فوماریک است. همچنین حاوی ۱۰ تا ۲۰ درصد آلکالوئید است (Yazdani *et al.*, 2003; Tavakkoli & Assadi, 2017).

آلکالوئیدها به‌دلیل سمیتی که دارند، به‌عنوان یک ابزار اصلی برای محافظت از گیاهان در برابر آفات عمل می‌کنند (Srivasatava, 2022). تاکنون بیش از ۴۰ نوع آلکالوئید در خشخاش شناسایی شده است که مهم‌ترین آن‌ها مورفین[1]، کدئین[2]، تبائین[3]، نوسکاپین[4]، و پاپاورین[5] است (Liscombe & Facchini, 2008). مورفین، آلکالوئید غالب گیاه خشخاش و یک مسکن طبیعی قوی است. کدئین و نوسکاپین به‌عنوان سرکوب‌کننده سرفه و پاپاورین شل‌کننده عضلات است. آلکالوئید تبائین مستقیماً برای درمان استفاده نمی‌شود، امّا به صورت صنعتی جهت ساخت مسکن‌های دیگر کاربرد دارد (Meos *et al.*, 2017). میزان بیوسنتز آلکالوئیدهای خشخاش علاوه‌بر خصوصیات ژنتیکی گیاه، به‌شدت تحت تأثیر فاکتورهای محیطی مختلف اعم از زنده و غیرزنده است (Facchini, 2001; Bourgaud *et al.*, 2001; Szabó *et al.*, 2008).

از عوامل غیرزنده مؤثر بر غلظت آلکالوئیدهای تولید شده در خشخاش، می‌توان به نور، دما، و انواعی از ترکیبات شیمیایی اشاره کرد (Srivastava & Sharma, 1990; Bennett *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005). از بین عوامل زنده نیز باکتری‌ها، قارچ‌ها و حشرات از اهمیت زیادی برخوردار هستند (Alcantara *et al.*, 2005; Ramos-Solano *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2004). در واقع، عوامل میکروبی اعم از بیماریزا و غیربیماریزا در نقش الیسیتور[6]های زنده می‌توانند میزان تولید آلکالوئیدهای خشخاش را تحت تأثیر قرار دهند. از جمله این عوامل می‌توان به باکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR)[7] اشاره کرد که از طریق مکانیسم‌های مختلفی نظیر حل‌کنندگی فسفات معدنی، تولید هورمون‌های رشد گیاهی، ترشح سیدروفورها، تثبیت نیتروژن، و غیره منجر به تحریک و بهبود رشد گیاهان نیز می‌شوند. تاکنون سویه‌ها و جدایه‌های متعددی از جنس‌های *Flavobacterium*، *Pseudomonas*، *Bacillus*، *Agrobacterium*، *Pantoea*، *Rhizobium*، *Aereobacter*، *Burkholderia*، *Achromobacter*، *Erwinia*، *Micrococcus*، و *Azotobacter* به‌عنوان عوامل PGPR مورد توجه قرار گرفته‌اند (Rodríguez & Fraga, 1999).

به‌کارگیری عوامل PGPR، نه تنها می‌تواند منجر به افزایش زیست‌توده گیاهی شود، بلکه به‌طور همزمان به‌دلیل نقشی که به‌عنوان الیسیتورهای زنده دارند، منجر به افزایش بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در گیاه می‌شود (Ramos-Solano *et al.*, 2010). این الیسیتورهای زنده مکانیسم‌های دفاعی در گیاهان را مورد هدف قرار می‌دهند و منتج به تحریک یک سری تغییرات متابولیکی در سرتاسر گیاه می‌شوند و به این طریق، گیاه متابولیسم دفاعی خود را تقویت می‌کند (van Loon *et al.*, 1998). به‌کارگیری عوامل PGPR به‌منظور تحریک گیاه به تولید متابولیت‌های ثانویه دارای مزایای متعددی است؛ نخست اینکه، در برخی از گیاهان، متابولیت‌های دفاعی ترکیبات زیستی فعالی هستند که منجر به القای تولید مواد غذایی با ارزش افزوده بالا در گیاه می‌شوند (Algar *et al.*, 2012). به‌عنوان مثال، در گیاه دارویی گل انگشتانه (*Digitalis lanata* L.) (Gutiérrez *et al.*, 2003) و نیز سویا (Algar *et al.*, 2012) منجر به افزایش سطح ایزوفلاون‌ها[8] می‌شوند. ثانیاً، به لحاظ فیزیولوژیکی، با افزایش سنتز متابولیت‌های ثانویه، مقاومت گیاه در برابر عوامل بیماری‌زا نیز افزایش می‌یابد (Ramos-Solano *et al.*, 2008; Conrath *et al.*, 2006). به‌طور مثال، این عوامل می‌توانند منجر به تقویت سیستم دفاعی در گیاه مدل *Arabidopsis thaliana* در برابر بیمارگرها شوند (Ramos-Solano *et al.*, 2008).

تاکنون مطالعات معدودی از نقش عوامل PGPR به‌عنوان الیسیتورهای زنده در بهبود تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی، به‌خصوص گیاه خشخاش انجام شده است. بر این اساس، پژوهش حاضر با هدف بررسی اثرات سویه‌هایی از عوامل PGPR با قابلیت حل‌کنندگی فسفات معدنی بر میزان تولید آلکالوئیدهای مورفین، پاپاورین و نوسکاپین در گیاه خشخاش انجام شده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

بذور خشخاش (*P. somniferum*) از رویشگاه‌های طبیعی واقع در استان فارس در عرض جغرافیایی "۵۶ '۱۰ °۳۵ شمالی و طول جغرافیایی "۱۷ '۲۳ °۵۹ شرقی، در طی تیر ۱۴۰۱ جمع‌آوری شد.

1- Morphine
2- Codeine
3- Thebaine
4- Noscapine
5- Papaverine
6- Elicitor
7- Plant growth promoting rhizobacteria
8- Isoflavones

سویه‌های باکتری

چهار سویه باکتریایی (S2, S7, S25, S36) که پیشتر براساس توانایی در حل‌کنندگی فسفات معدنی و ایجاد هاله شفاف در اطراف کلنی خود در محیط کشت Sperber (Sperber, 1958)، غربالگری و شناسایی شده بودند، از کلکسیون میکروبی مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور دریافت شد. اطلاعات مربوط به سویه‌ها در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- خصوصیات سویه‌های باکتریایی مورد استفاده در پژوهش حاضر

Table 1- The characteristics of the bacterial strains used in this research

سویه Strain	گونه Species	شماره دسترسی Accession number	طول توالی Sequence length (kb)
S2	*Enterobacter xiangfangensis*	MW687115	1460
S7	*Pantoea dispersa*	MW687122	1472
S25	*Pantoea stewartii*	MW704276	633
S36	*Pseudomonas canadensis*	MW687114	1464

بررسی توانایی سویه‌های باکتریایی در حل‌کنندگی فسفات معدنی به‌روش کمّی

برای بررسی توان سویه‌ها در انحلال تری کلسیم فسفات به‌عنوان منبع فسفات معدنی نامحلول از محیط کشت مایع Sperber (دکستروز ۱۰ گرم بر لیتر، عصاره مخمر ۰/۵ گرم بر لیتر، کلرید کلسیم ۰/۱۴ گرم بر لیتر، سولفات منیزیوم ۰/۳۲ گرم بر لیتر، تری کلسیم فسفات ۲/۵ گرم بر لیتر، آب مقطر ۱۰۰۰ میلی‌لیتر، اسیدیته ۷)، استفاده شد. ابتدا سویه‌های باکتریایی به‌مدت ۴۸ ساعت در محیط جامد Sperber در سه تکرار رشد داده شدند. سپس ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هر باکتری به ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محیط مایع Sperber منتقل شد. ارلن‌ها به‌مدت ۱۲۰ ساعت داخل شیکر انکوباتور با سرعت ۱۲۰ دور بر دقیقه و دمای ۲۷C±۲° تکان داده شدند. به‌طور هم‌زمان سوسپانسیون باکتری سانتریفوژ شده و یک میلی‌لیتر از محلول رویی با یک میلی‌لیتر از محلول مولیبدات وانادات رقیق کرده و سپس با سه میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط گردید. بعد از گذشت یک ساعت، میزان جذب نور با استفاده از اسپکتروفتومتر در ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. مقدار فسفر محلول آزاد شده توسط هر سویه براساس منحنی استاندارد تهیه شده از غلظت‌های مختلف KH_2PO_4 محاسبه شد (Alikhani *et al.*, 2014).

مطالعات گلخانه‌ای

در مهرماه سال ۱۴۰۱، بذور خشخاش در گلدان‌هایی با ابعاد ۱۴cm × ۱۵ cm × ۱۵ cm که محتوی بستری به وزن تقریبی ۲۲۰۰ گرم با ترکیب خاک زراعی، ماسه شسته شده، خاک برگ و کود گاوی پوسیده (۲:۱:۱:۱) بود، کشت شدند. پس از کشت بذور، گلدان‌ها به گلخانه پژوهشی مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور در دمای ۲۵C±۲°، با شدت نور ۳۰۰۰ لوکس منتقل شدند. در طی دوره داشت (۱۵۰ روز)، گلدان‌ها به‌صورت یک روز در میان آبیاری می‌شدند و وجین علف‌های هرز انجام می‌شد. مرحله برداشت بوته‌های خشخاش تیمار شده در خرداد سال ۱۴۰۲ انجام گرفت.

تیمار بوته‌های خشخاش با سویه‌های باکتریایی

در ابتدا از کشت ۴۸ ساعته سویه‌های باکتریایی بر روی محیط کشت NA سوسپانسیونی با جمعیت 10^8 CFU.ml^{-1} تهیه شد. به منظور کاهش کشش سطحی، به سوسپانسیون حاصل به‌میزان (V/V) ۰/۰۵ درصد توپین ۲۰ (Tween 20) اضافه شد. شاهد فقط شامل مخلوط آب مقطر استریل و توپین ۲۰ بود. حدود سه هفته پس از ظهور کپسول در بوته‌های خشخاش، اندام‌های هوایی گیاه (ساقه، برگ، و کپسول) توسط سوسپانسیون باکتری‌ها محلول‌پاشی شدند. یک هفته پس از محلول‌پاشی، بوته‌های خشخاش به‌منظور ردیابی و تعیین میزان آلکالوئیدهای مورد نظر برداشت شدند. به‌ازای هر تیمار سه گلدان در نظر گرفته شد و در هر گلدان نیز سه عدد بوته خشخاش موجود بود.

استخراج آلکالوئیدها

جهت استخراج آلکالوئیدها از بافت گیاهی خشخاش‌های تیمار شده با سویه‌های باکتریایی، نمونه‌های گیاهی (ساقه، برگ، و کپسول) خشک شده با دستگاه آسیاب برقی پودر شدند. به‌۳۰ میلی‌گرم از نمونه‌های گیاهی خشک و پودر شده، ۱/۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد (pH=4) اضافه گردید. مخلوط حاصل به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰C° در داخل حمام التراسونیک (Bandelin sonorex, DL) گذاشته شد تا عصاره آن استخراج شود. بعد از هر مرحله از استخراج، نمونه‌ها جهت جداسازی ذرات معلق به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ g سانتریفیوژ شدند و مجدداً تا سه مرتبه تمام مراحل استخراج جهت استخراج حداکثری آلکالوئیدها تکرار شد. در نهایت، ماحصل هر سه مرحله عصاره‌گیری با هم ترکیب و ۲۰ میکرولیتر از این مخلوط جهت جداسازی ترکیبات به دستگاه HPLC تزریق شد (Paulsen *et al.*,

2015). قبل از تزریق نمونه‌ها به دستگاه HPLC، مخلوطی از غلظت های مختلف استانداردهای آلکالوئیدی جهت رسم منحنی شیب خط به دستگاه تزریق شدند. نوع ستون مصرفی در HPLC از نوع ۱۸C-RP و حلال مورد استفاده، متانول و آب حاوی دو درصد استیک اسید بود. ردیاب از نوع ماورای بنفش و طول موج مورد استفاده ۲۸۰ نانومتر بود.

مشخصات دستگاه HPLC

تجزیه HPLC نمونه‌ها با استفاده از یک سیستم گرادیانت با استفاده از ستون Nucleosil RP-18 (5µ) 100 Å توسط دستگاه Agilent سری ۱۲۰۰ انجام شد. دو حلال مورد استفاده در این سیستم گرادیانت شامل A- متانول حاوی دو درصد اسید استیک؛ B- آب حاوی دو درصد اسید استیک بود. برنامه گرادیانت HPLC در نقطه ابتدایی شامل ۱۰ درصد از حلال A و ۹۰ درصد از حلال B بود که این نسبت تا دقیقه ۵ همچنان بدون تغییر بود. از دقیقه ۵ تا دقیقه ۲۰، درصدها در مورد A و B به‌صورت گرادیانت به‌ترتیب به ۸۵ درصد و ۱۵ درصد رسید. سرعت جریان و حجم تزریق نمونه‌ها به دستگاه به ترتیب یک میلی‌لیتر در دقیقه و ۲۰ میکرولیتر بود. پایش آلکالوئیدهای مورفین، پاپاورین و ناسکاپین توسط آشکارساز ماورای بنفش در ۲۸۰ نانومتر انجام شد. کمّی‌سازی غلظت این ترکیبات آلکالوئیدی براساس یک منحنی کالیبراسیون با استفاده از پنج رقت سریال استاندارد پاپاورین بود که از ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تا پنج میکروگرم در میلی‌لیتر متغیر بود. استانداردهای مورد استفاده در این تحقیق از شرکت تولید مواد اولیه داروپخش (تماد) خریداری شده بود.

خصوصیات و مقادیر استانداردها

استانداردهای مورفین و نوسکاپین به غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و استاندارد پاپاورین به غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. سپس مخلوط به نسبت‌های ۱، ۱:۵۰، ۱:۱۰، ۱:۵۰ و ۱:۱۰۰ تهیه و به دستگاه HPLC جهت رسم منحنی کالیبراسیون تزریق شد.

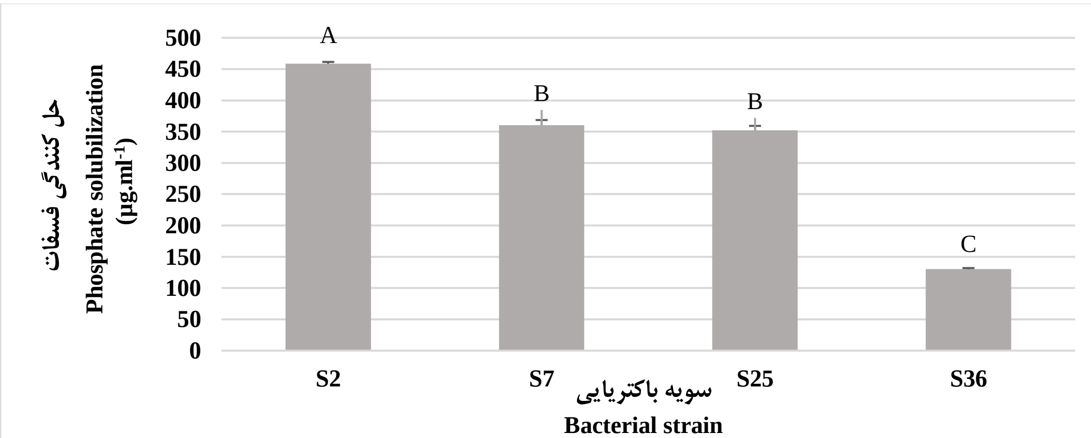
تجزیه و تحلیل داده‌های آماری

تمامی آزمایش‌ها در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی و با سه تکرار به‌ازای هر تیمار انجام شد. داده‌های حاصل از پژوهش حاضر به کمک نرم‌افزار آماری (Version 26; SPSS Inc., IBM Company SPSS Chicago, USA)، تجزیه و تحلیل شدند و مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

نتایج و بحث

توانایی سویه‌های باکتریایی در حل‌کنندگی فسفات معدنی به‌روش کمّی

همان‌گونه که در شکل ۱ نشان داده شده است، هر چهار سویه باکتریایی مورد بررسی از توانایی در حل کنندگی فسفات معدنی برخوردار بودند. بیشترین و کمترین میزان حل کنندگی فسفات به‌ترتیب مربوط به سویه‌های S2 و S36 بود. سویه‌های S7 و S25 نیز به لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند و پس از سویه S2، در دومین جایگاه آماری قرار گرفتند. تجزیه واریانس داده‌های مربوطه در جدول ۲ آورده شده است.



شکل ۱- مقایسه توانایی سویه‌های باکتریایی در میزان حل‌کنندگی فسفات معدنی در محیط کشت مایع Sperber

Figure 1- Comparison of the ability of bacterial strains to solubilize inorganic phosphate in Sperber broth medium (DMRT, p<0.05) (n=3)

جدول ۲- تجزیه واریانس حل‌کنندگی فسفات توسط سویه‌های باکتریایی (P<0.05) (n=3)

Table 2- ANOVA for the solubility of phosphate by bacterial strains (P<0.05) (n=3)

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean squares	ارزش F F-value
تیمار Treatment	3	57698.6**	1820.42
تکرار Replication	2	31.5	0.99
خطا Error	6	31.7	
کل Total	11		

**: معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد

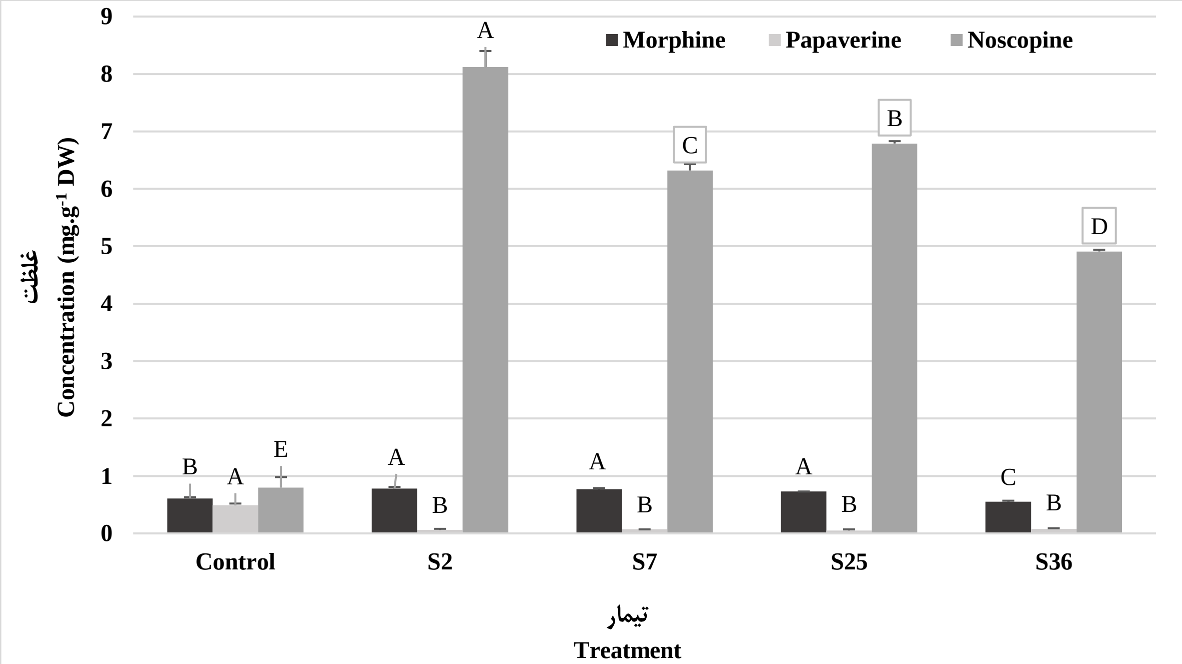
**: significant at $p \leq 0.01$

به این ترتیب، نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که سویه‌های باکتریایی بررسی شده که متعلق به گونه‌های *E. xiangfangensis*، *P. dispersa*، *P. stewartii* و *P. canadensis* بودند، از کارآمدی مطلوبی در حل‌کنندگی فسفات معدنی برخوردار بودند و می‌توان آن‌ها را به‌عنوان باکتری‌های حل‌کننده فسفات معرفی کرد. قریشی و اعتمادی فر (Ghoreishi and Etemadifar, 2017) نیز گزارش کردند که سویه بررسی شده که متعلق به *E. xiangfangensis* بود، از توانایی در تولید اسیدفسفاتاز و در نتیجه، حل‌کنندگی فسفات معدنی برخوردار بود. چن و همکاران (Chen *et al.*, 2014) نشان دادند که باکتری *P. dispersa* از طریق تولید انواعی از اسیدهای آلی قادر به حل‌کنندگی فسفات معدنی است. هو و همکاران (Hu *et al.*, 2010) نیز اظهار داشتند که جدایه g6 از باکتری *P. stewartii* از کارایی بالایی به لحاظ حل‌کنندگی فسفات معدنی برخوردار بود. بلانکو-وارگس و همکاران (Blanco-Vargas *et al.*, 2020) نیز نشان دادند که سویه‌های باکتریایی متعلق به جنس *Pseudomonas* sp. قادر به حل‌کنندگی فسفات معدنی هستند. به این ترتیب، نتایج حاصل از پژوهش حاضر با نتایج سایر پژوهشگران سازگاری دارد.

اثر سویه‌های باکتریایی بر غلظت برخی آلکالوئیدهای خشخاش

همان‌گونه که در شکل ۱ نشان داده شده است، تیمار بوته‌های خشخاش با سویه‌های باکتریایی حل‌کننده فسفات، در اغلب موارد منتج به بروز تغییرات معنی‌داری در سطح آلکالوئیدهای مورفین، پاپاورین، و نوسکاپین در ساقه و برگ خشخاش شد. در بررسی میزان آلکالوئید مورفین در ساقه و برگ خشخاش مشخص شد که تیمار با سویه‌های S2، S7، و S25 به‌طور معنی‌داری منجر به افزایش سطح مورفین در قیاس با شاهد شد (P<0.05). این در حالی است که تیمار با سویه S36 کاهش معنی‌داری در سطح مورفین در قیاس با شاهد منتج شد. تیمار با سویه‌های باکتریایی مورد مطالعه نیز منجر به کاهش معنی‌داری در غلظت آلکالوئید پاپاورین در ساقه و برگ خشخاش نسبت به شاهد شد. این در حالی است که میزان آلکالوئید نوسکاپین در ساقه و برگ خشخاش در تیمار با تمامی سویه‌های باکتریایی مورد مطالعه افزایش معنی‌داری در قیاس با شاهد نشان داد. بیشترین میزان افزایش به‌ترتیب مربوط به تیمار با سویه‌های S2، S25، S7، و S36 بود. نتایج تجزیه واریانس آورده شده در جدول ۳، نشان داد که اثر متقابل نوع آلکالوئید و به‌کارگیری سویه‌های باکتریایی حل‌کننده فسفات بر غلظت آلکالوئیدهای مورد مطالعه در ساقه و برگ خشخاش معنی‌دار است (P<0.01).

براساس نتایج آورده شده در شکل ۳، به‌کارگیری سویه‌های باکتریایی حل‌کننده فسفات منجر به افزایش معنی‌داری در میزان آلکالوئید مورفین موجود در کپسول بوته‌های خشخاش در قیاس با شاهد شد (P<0.05). از این نظر تیمارهای S25 و S36 در گروه اول آماری قرار گرفتند و با S2 اختلاف آماری معنی‌داری نشان ندادند. کمترین میزان آلکالوئید مورفین در کپسول خشخاش نیز مربوط به شاهد بود. این در حالی است که تیمار بوته‌های خشخاش با سویه‌های باکتریایی منجر به تغییر معنی‌داری در سطح آلکالوئید پاپاورین در کپسول خشخاش در قیاس با شاهد نشد. محلول‌پاشی سوسپانسیون سویه‌های S2 و S36 به‌طور معنی‌داری منجر به افزایش غلظت آلکالوئید نوسکاپین در کپسول خشخاش شد. این در حالی است که از این نظر تیمارهای S7 و S25 اختلاف آماری معنی‌داری با شاهد نشان ندادند (شکل ۳). نتایج تجزیه واریانس آورده شده در جدول ۴، نیز نشان داد که اثر متقابل نوع آلکالوئید و به‌کارگیری سویه‌های باکتریایی حل‌کننده فسفات بر غلظت آلکالوئیدهای مورد مطالعه در کپسول خشخاش معنی‌دار است (P<0.01).



شکل ۲- اثر سویه‌های باکتریایی حل‌کننده فسفات بر میزان آلکالوئیدهای مورفین، پاپاورین، و نوسکاپین ساقه و برگ خشخاش

Figure 2- The effect of phosphate-solubilizing bacterial strains on the amount of morphine, papaverine, and noscapine alkaloids in poppy stems and leaves (DMRT, *p*<0.05) (n=3)

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر باکتری‌های حل‌کننده فسفات بر آلکالوئیدهای برگ و ساقه *P. somniferum*

Table 3- ANOVA for the effect of phosphate solubilizing bacteria on the alkaloids of *P. somniferum* leaves and stems

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی Df	میانگین مربعات Mean squares	ارزش F F-value
آلکالوئیدها Alkaloids (A)	2	124.54**	15200.19
تیمار Treatment (T)	4	7.33**	895.19
تیمار × آلکالوئید A × T	8	8.24**	1006.18
خطا Error	30	0.01	
کل Total	44		

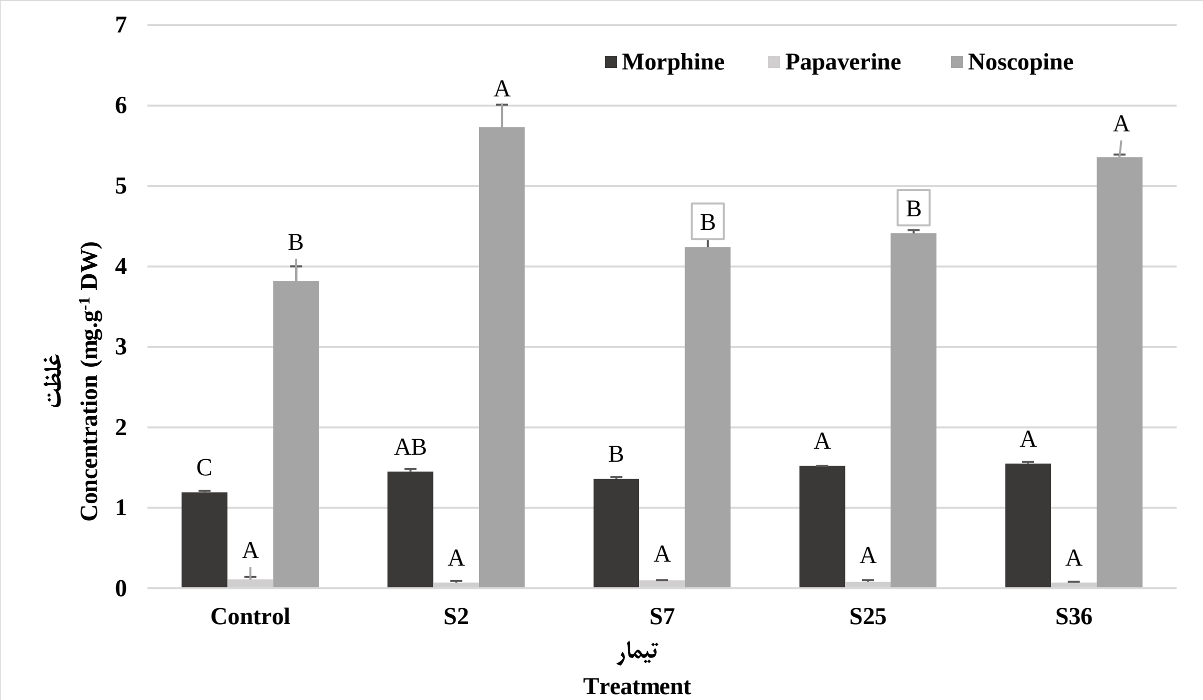
**: معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد

**: significant at $p \leq 0.01$

پژوهش‌های متعددی اظهار می‌دارند که عوامل PGPR از جمله باکتری‌های حل‌کننده فسفات، می‌توانند به‌عنوان الیسیتورهای زنده عمل کنند و منجر به القای تولید انواعی از متابولیت‌های ثانویه در گیاهان شوند (Sekar & Kandavel, 2010). مثال‌های متعددی از ارزیابی اثرات این عوامل میکروبی مفید بر تولید انواعی از متابولیت‌های ثانویه ارزشمند توسط برخی گیاهان دارویی موجود است. به‌عنوان مثال، احمدزاده و همکاران (Ahmadzadeh *et al*., 2022) گزارش کردند که تیمار بذور و یا ریشه‌های گیاهچه‌های گیاه دارویی گل پریوش (*Catharanthus roseus*) با سویه ۱۶۹ از باکتری *Pseudomonas fluorescens* منجر به افزایش قابل توجهی در میزان آلکالوئیدهای وین بلاستین[1] و وین کریستین[2] که از خاصیت قوی ضدسرطان برخوردارند، در قیاس با شاهد می‌شود.

1- Vinblastine

2- Vincristine



شکل ۳- اثر سویه‌های باکتریایی حل‌کننده فسفات بر میزان آلکالوئیدهای مورفین، پاپاورین، و نوسکاپین کپسول خشخاش

Figure 3- The effect of phosphate-solubilizing bacterial strains on the amount of morphine, papaverine, and noscapine alkaloids in the poppy capsule (DMRT, *p*<0.05) (n=3)

جدول ٤- تجزیه واریانس اثر باکتری‌های حل‌کننده فسفات بر آلکالوئیدهای کپسول *P. somniferum*

Table 4- ANOVA for the effect of phosphate solubilizing bacteria on the alkaloids of *P. somniferum* capsule

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی Df	میانگین مربعات Mean squares	ارزش F F-value
آلکالوئیدها Alkaloids (A)	2	85.10**	2150.455
تیمار Treatment (T)	4	0.79**	19.980
تیمار × آلکالوئید A × T	8	0.60**	15.134
خطا Error	30	0.04	
کل Total	44		

**: معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد

**: significant at $p \leq 0.01$

قربانپور و همکاران (Ghorbanpour *et al.*, 2013) نیز نشان دادند که تیمار گیاه دارویی بذرالبنج (*Hyoscyamus niger*) با باکتری‌های *Pseudomonas putida* و *P. fluorescens* منجر به افزایش معنی‌داری در میزان آلکالوئیدهای هیزوسیامین[1] و اسکوپولامین[2] موجود در ریشه و اندام‌های هوایی گیاه در قیاس با شاهد شد. همچنین مامتا و همکاران (Mamta *et al.*, 2010) اظهار داشتند که تیمار بوته‌های شیرین برگ (*Stevia rebaudiana*) با باکتری‌های حل‌کننده فسفات جداسازی شده از ریزوسفر این گیاه دارویی نه تنها منجر به افزایش رشد گیاهان شد، بلکه افزایش سطح متابولیت‌های

1- Hyoscyamine

2- Scopolamine

ثانویه‌ای چون استویوزید[1] و ربودیوزید-آ[2] را نیز سبب شد. بیشترین کارایی مربوط به سویه ۱۰۲۱۶ از باکتری *Burkholderia gladioli* بود که توانست میزان استویوزید و ربودیوزید-آ را به‌ترتیب ۱۵۰ درصد و ۵۵۵ درصد در هر گیاه در قیاس با شاهد افزایش دهد. بر طبق گزارش پراکاش و آرورا (Prakash & Arora, 2019) ، تیمار بوته‌های گیاه دارویی نعنای وحشی (*Mentha arvensis*) با جدایه STJP از باکتری *Bacillus* sp. که از ریزوسفر *S. rebaudiana* جداسازی شده بود و از توانایی در حل‌کنندگی فسفات معدنی برخوردار بود، منجر به افزایش عملکرد عصاره و مقدار منتول موجود در آن شد. بر طبق نتایج این پژوهش نیز ریزوباکترهای حل‌کننده فسفات معدنی مورد مطالعه توانستند به‌عنوان الیسیتورهای زنده بر میزان بیوسنتز آلکالوئیدهای مورفین، پاپاورین، و نوسکاپین موجود در کپسول، ساقه، و برگ خشخاش به‌طور معنی‌داری تأثیر بگذارند. به این ترتیب، نتایج حاصل در موافقت و هم‌راستای مثال‌های ذکر شده است.

بنیلا و همکاران (Bonilla *et al.*, 2014) گزارش کردند که عوامل PGPR می‌توانند به‌عنوان الیسیتورهای زنده منجر به افزایش سطح برخی آلکالوئیدهای گیاه خشخاش (*P. somniferum*) شوند. این پژوهشگران به بررسی اثر تیمار بوته‌های خشخاش (*P. somniferum*) با جدایه‌های *Stenotrophomonas maltophilia* (N5.18)، *Chryseobacterium balustinum* (Aur9) و (N21.4) *P. fluorescens*، بر میزان آلکالوئیدهای مورفین، تبائین، کدئین، و اوریپاوین[3] موجود در برگ (محلول‌پاشی) و ریشه (افزودن به خاک) پرداختند. بر طبق نتایج به‌دست آمده، مشخص شد که سویه‌های باکتریایی مختلف می‌توانند بر سطح آلکالوئیدهای موجود در برگ و یا ریشه خشخاش اثرات متفاوتی نشان دهند. به گونه‌ای که محلول‌پاشی بوته‌های خشخاش با جدایه N5.18، منجر به افزایش معنی‌داری در سطح آلکالوئیدهای مورفین، تبائین، و کدئین برگ شد، ولی مقدار اوریپاوین کاهش معنی‌داری داشت. همچنین تیمار با جدایه N21.4 منجر به کاهش معنی‌داری در سطح مورفین و اوریپاوین برگ شد، ولی سطح کدئین و تبائین افزایش یافت. این در حالی بود که در تیمار با جدایه N21.4، سطح مورفین، کدئین، و تبائین در ریشه افزایش ناچیزی داشت و سطح اوریپاوین بدون تغییر ماند. تیمار با جدایه N5.18، منجر به کاهش معنی‌داری در سطح تبائین، کدئین و اوریپاوین موجود در ریشه شد، ولی میزان مورفین افزایش یافت. یافته‌های پژوهش حاضر نیز نشان می‌دهد که سطح آلکالوئیدهای مورد مطالعه (مورفین، پاپاورین و نوسکاپین) در برگ و کپسول بوته‌های خشخاش محلول‌پاشی شده با جدایه‌های باکتریایی مورد مطالعه یکسان نبود. در تیمار با سویه‌های باکتریایی مورد مطالعه مشخص شد که میزان پاپاورین موجود در برگ و ساقه در قیاس با شاهد کاهش معنی‌داری داشت، ولی میزان آن در کپسول تغییرات معنی‌داری نداشت. میزان مورفین موجود در برگ در تمامی تیمارهای باکتریایی به‌جز S36 افزایش معنی‌داری را در قیاس با شاهد منتج شد. درحالی‌که مقدار آن در کپسول حتی در تیمار با S36، افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد نشان داد. در بررسی نوسکاپین نیز مشخص شد که میزان آن در برگ و ساقه در تمامی تیمارهای باکتریایی افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد داشت، ولی در بررسی کپسول مشخص شد که تنها تیمارهای S36 و S2 منجر به افزایش معنی‌داری در آن شدند. همچنین مشخص شد که اثر متقابل نوع آلکالوئید و به‌کارگیری سویه‌های باکتریایی حل‌کننده فسفات بر غلظت آلکالوئیدهای مورد مطالعه در کپسول، ساقه و برگ خشخاش معنی‌دار است. به این ترتیب، نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر در موافقت با یافته‌های سایر پژوهشگران است.

نتیجه‌گیری

به این ترتیب می‌توان نتیجه‌گیری کرد که به‌منظور افزایش دستیابی به متابولیت‌های ثانویه ارزشمند گیاهان دارویی لزوماً نیازی به اعمال دستورزی‌های ژنتیکی نیست، بلکه با صرف هزینه‌های بسیار پایین‌تر، می‌توان با به‌کارگیری الیسیتورهای باکتریایی به این هدف دست یافت. در خصوص گیاه دارویی خشخاش نیز مشخص شد که با انتخاب سویه‌های باکتریایی سازگار و کارآمد از گروه باکتری‌های حل‌کننده فسفات، می‌توان سطح آلکالوئیدهای مورفین، پاپاورین، و نوسکاپین را در اندام‌های هوایی به‌طور چشمگیری افزایش داد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از همکاری پرسنل محترم مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور کمال تشکر و قدردانی می‌شود.

1- Stevioside
2- Rebaudioside-A
3- Oripavine

References

1- Ahmadzadeh, M., Keshtkar, A.H., Moslemkhany, K., & Ahmadzadeh, M. (2022). Effect of the plant probiotic bacteria on terpenoid indole alkaloid biosynthesis pathway gene expression profiling, vinblastine and vincristine content in the root of *Catharanthus roseus*. *Molecular Biology Reports, 49*(11), 10357-10365. https://doi.org/10.1007/s11033-022-07841-z

2- Alcantara, J., Bird, D.A., Franceschi, V.R., & Facchini, P.J. (2005). Sanguinarine biosynthesis is associated with the endoplasmic reticulum in cultured opium poppy cells after elicitor treatment. *Plant Physiology*, *138*(1), 173-183. https://doi.org/10.1104/pp.105.059287

3- Algar, E., Gutierrez-Mañero, F.J., Bonilla, A., Lucas, J.A., Radzki, W., & Ramos-Solano, B. (2012). *Pseudomonas fluorescens* N21.4 metabolites enhance secondary metabolism isoflavones in soybean (*Glycine max*) calli cultures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(44), 11080-11087. https://doi.org/10.1021/jf303334q

4- Alikhani, H.A., Allah Dadi, I., Rashtbari, M., & Rajabpour, B. (2014). Applied methods of soil biology laboratory. University of Tehran Press, Tehran, Iran. 271 p. (In Persian)

5- Bennett, J.O., Yu, O., Heatherly, L.G., & Krishnan, H.B. (2004). Accumulation of genistein and daidzein, soybean isoflavones implicated in promoting human health, is significantly elevated by irrigation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(25), 7574-7579. https://doi.org/10.1021/jf049133k

6- Blanco-Vargas, A., Rodríguez-Gacha, L.M., Sánchez-Castro, N., Garzón-Jaramillo, R., Pedroza-Camacho, L.D., Poutou-Piñales, R.A., Rivera-Hoyos, C.M., Díaz-Ariza, L.A., & Pedroza-Rodríguez, A.M. (2020). Phosphate-solubilizing *Pseudomonas* sp., and *Serratia* sp., co-culture for *Allium cepa* L. growth promotion. *Heliyon*, *6*(10), e05218. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05218

7- Bonilla, A., Sarria, A.L.F., Algar, E., Muñoz Ledesma, F.J., Ramos-Solano, B., Fernandes, J.B., & Gutierrez Mañero, F.J. (2014). Microbe associated molecular patterns from rhizosphere bacteria trigger germination and *Papaver somniferum* metabolism under greenhouse conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*, *74*, 133-140.

8- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., & Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, *161*(5), 839-851. https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00490-3

9- Chen, Y., Fan, J.B., Du, L., Xu, H., Zhang, Q.H., & He, Y.Q. (2014). The application of phosphate solubilizing endophyte *Pantoea dispersa* triggers the microbial community in red acidic soil. *Applied Soil Ecology*, *84*, 235-244. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.05.014

10- Conrath, U., Beckers, G.J.M., Flors, V., García-Agustín, P., Jakab, G., & Mauch, F. (2006). Priming: getting ready for battle. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *19*(10), 1062-1071. https://doi.org/10.1094/MPMI-19-1062

11- Facchini, P.J. (2001). Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, *52*, 29-66. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.29

12- Ghorbanpour, M., Hatami, M., & Khavazi, K. (2013). Role of plant growth promoting rhizobacteria on antioxidant enzyme activities and tropane alkaloid production of *Hyoscyamus niger* under water deficit stress. *Turkish Journal of Biology*, *37*, 350–360. https://doi.org/10.3906/biy-1209-12

13- Ghoreishi, F.S., & Etemadifar, Z. (2017). Heavy metal removal by phosphate-solubilizing *Enterobacter xiangfangensis* isolated from rhizosphere. *Journal of Microbial World*, *10*(2), 145-156. (In Persian)

14- Gutiérrez Mañero, F.J., Ramos, B., Lucas García, J.A., Probanza, A., & Barrientos Casero, M.L. (2003). Systemic induction of terpenic compounds in *Digitalis lanata*. *Journal of Plant Physiology*, *160*, 105– r130.

15- Hu, X.J., Li, Z.J., Cao, Y.C., Zhang. J., Gong, Y.X., & Yang, Y.F. (2010). Isolation and identification of a phosphate-solubilizing bacterium *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* g6, and effects of temperature, salinity, and pH on its growth under indoor culture conditions. *Aquaculture International*, *18*(6), 1079-1091. https://doi.org/10.1007/s10499-010-9325-8

16- Kim, S.H., Jung, W.S., Ahn, J.K., Kim, J.A., & Chung, I.M. (2005). Quantitative analysis of the isoflavone content and biological growth of soybean (*Glycine max* L.) at elevated temperature, CO_2 level and N application. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *85*(15), 2557-2566. https://doi.org/10.1002/jsfa.2294

17- Liscombe, D.K., & Facchini, P.J. (2008). Evolutionary and cellular webs in benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis. *Current Opinion in Biotechnology*, *19*(2), 173-180. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.02.012

18- Mamta, R.P., Pathania, V., Gulati, A., Singh, B., Bhanwra, R.K., & Tewari, R. (2010). Stimulatory effect of phosphate-solubilizing bacteria on plant growth, stevioside and rebaudioside-A contents of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Applied Soil Ecology*, *46*, 222-229.

19- Meos, A., Saks, L., & Raal, A. (2017). Content of alkaloids in ornamental *Papaver somniferum* L. cultivars growing in Estonia. *The Proceedings of the Estonian Academy of Sciences*, *66*(1), 34. http://doi.org/10.3176/proc.2017.1.04

20- Paulsen, J., Yahyazadeh, M., Hänsel, S., Kleinwächter, M., Ibrom, K., & Selmar, D. (2015). 13,14- dihydrocoptisine-the genuine alkaloid from *Chelidonium Majus*. *Phytochemistry*, *111*, 149-153. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.01.006

21- Prakash, J., & Arora, N.K. (2019). Phosphate-solubilizing *Bacillus* sp. enhances growth, phosphorus uptake and oil yield of *Mentha arvensis* L. *3 Biotechnology*, *9*(4), 126. https://doi.org/10.1007/s13205-019-1660-5
22- Ramos-Solano, B., Barriuso Maicas, J., La Pereyra de Iglesia, M.T., Domenech, J., & Gutiérrez Mañero, F.J. (2008). Systemic disease protection elicited by plant growth promoting rhizobacteria strains: Relationship between metabolic responses, systemic disease protection, and biotic elicitors. *Phytopathology*, *98*(4), 451-457. https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-4-0451
23- Ramos-Solano, B., Algar, E., García-Villaraco, A., García-Cristóbal, J., Lucas García, J.A., & Gutierrez-Mañero, F.J. (2010). Biotic elicitation of isoflavone metabolism with plant growth promoting rhizobacteria in early stages of development in *Glycine max* var. *Osumi*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(3), 1484-1492. https://doi.org/10.1021/jf903299a
24- Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, *17*(4-5), 319-339.
25- Sekar, S., & Kandavel, D. (2010) Interaction of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and endophytes with medicinal plants for phytochemicals. *Journal of Phytology*, *2*(7), 91-100.
26- Silva, H.S.A., Da Romeiro, R.S., Macagnan, D., Halfeld-Vieira, B.D.A., Pereira, M.C.B., & Mounteer, A. (2004). Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: Non-specific protection and increase in enzyme activities. *Biological Control*, *29*(2), 288-295. https://doi.org/10.1016/S1049-9644(03)00163-4
27- Sperber, J.I. (1958). Solubilization of apatite by soil microorganisms producing organic acids. *Australian Journal of Agricultural Research*, *9*, 782-787. https://doi.org/10.1071/AR9580782
28- Srivasatava, P. (2022). Chapter 13 Use of alkaloids in plant protection. In Ravindra Soni, Deep Chandra Suyal, Reeta Goel (Eds.): Plant Protection: De Gruyter, pp. 337–352
29- Srivastava, N.K., & Sharma, S. (1990). Effect of triacontanol on photosynthesis, alkaloid content and growth in opium poppy (*Papaver somniferum* L.). *Plant Growth Regulation*, *9*(1), 65-71. https://doi.org/10.1007/BF00025280
30- Szabó, B., Lakatos, A., Koszegi, T., & Botz, L. (2008): Investigation of abiogenic stress-induced alterations in the level of secondary metabolites in poppy plants (*Papaver somniferum* L.). *Acta Biologica Hungarica*, *59*(4), 425-438. https://doi.org/10.1556/ABiol.59.2008.4.4
31- Tavakkoli, Z., & Assadi, M. (2017). Papaveraceae. In: Flora of Iran. Vol: 127. Research Institute of Forests and Rangelands Press, Tehran, Iran. p. 79. (In Persian)
32- van Loon, L.C., Bakker, P.A., & Pieterse, C.M. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, *36*, 453-483. https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.36.1.453
33- Yazdani, D., Rezazadeh, S., & Shahnazi, S. (2003). Review of poppy (*Papaver somniferum* L.). *Journal of Medicinal Plants*, *2*(5), 1-12. (In Persian)